

Vol. 4 No. A

QUIMICA HOY

Chemistry Sciences

Revista de la Universidad Autónoma de Nuevo León
a través de la Facultad de Ciencias Químicas

Julio - Septiembre de 2014

ISSN 2007-1183



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

SIMPOSIO NACIONAL CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOMEDICINA



Revista Química Hoy



@QuimicaHoy



·Visión·
2020
UANL

Control opto-espacial de expresión genética en *Escherichia coli*, para el diseño de terapias inteligentes

Esther Baltazar-Encarnación^a, José Rubén Morones-Ramírez^a

^aFacultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Laboratorio de Biotecnología, Av. Universidad s/n, Cd. Universitaria, C.P.66400, San Nicolás de los Garza, N. L., México.

Resumen

En el campo de la medicina el uso de fármacos (diagnóstico y tratamiento farmacológico) presentan diversos riesgos en la salud del usuario; ya que algunos pacientes pueden presentar reacciones adversas, secundarias, de interacción e inmunológicas con los medicamentos actuales, las consecuencias de estas reacciones pueden ser de distintos grados; desde leves, incapacitante e incluso causar la muerte; por lo que el uso de agentes terapéuticos específicos y controlados son necesarios. Utilizando la interface entre la biología sintética y la nanotecnología, proponemos el diseño de un material (bacteria), con sensibilidad opto-térmica; es decir, que la sinergia entre la capacidad de las nanopartículas metálicas para convertir la luz absorbida en calor y la propiedad de respuesta térmica del termómetro de RNA, permitan una respuesta a la exposición de longitudes de onda concretas a nivel local, y además puedan ser controlados con el uso de incrementos globales en la temperatura del sistema, permitiendo con ello un precursor viable para el diseño posterior de nuevos agentes terapéuticos que actúen de forma específica y controlada.

Palabras clave: biosíntesis, fármacos controlados, nanopartículas (NPs), Opto térmic

1. Introducción.

Debido a que los nanomateriales son similares en escala a las moléculas y sistemas biológicos, la nanotecnología es potencialmente útil en aplicaciones médicas [1-5]. El campo de la nanomedicina tiene como objetivo utilizar las propiedades y características físicas de los nanomateriales en el diagnóstico y tratamiento de las enfermedades a nivel molecular [6]. Los nanomateriales están siendo diseñados para facilitar el diagnóstico o el transporte de agentes terapéuticos a través de las barreras biológicas; obtener acceso a las moléculas para mediar interacciones moleculares y sensibles al detectar cambios moleculares de alto rendimiento (Kim et al, 2010), ya que pueden cruzar a través del sistema vascular y localizar cualquier órgano diana.; potencialmente, esto puede dar lugar a nuevas terapias, formación de imágenes, y aplicaciones biomédicas [5-7].

Los termómetros de ARN son sistemas de control genético complejos basados en ARN que cambian su conformación en respuesta a la temperatura [8-10]. A bajas temperaturas, el ARNm adopta una conformación que enmascara los sitios de unión al ribosoma [secuencia de Shine-Dalgarno (SD)] dentro de la región 5' no traducida (UTR-5') y de esta manera, evita la unión de ribosomas y la traducción. A temperaturas elevadas la estructura secundaria del ARN se relaja (desdobla la estructura de tallo y asa), dando acceso a los sitios de unión de los ribosomas para iniciar la traducción [8-11].

2. Parte experimental

Bacterias recombinantes.

La metodología para construir los plásmidos incluyó métodos clásicos para su clonación (digestión, ligación y transformación), se utilizó como vector de clonación el plásmido pUC57 con la secuencia sintetizada de oligonucleótidos que codifica a la proteína quelante,

para transformar *Escherichia coli* (E. coli) K12 DH5 α (resistencia a la ampicilina) y se transformó *Escherichia coli* Top10 utilizando como vector de clonación el plásmido pUC57-Kan (resistencia a la Kanamicina) portador de la región de codificación de mcherry y la secuencia sintética de oligonucleótidos (termosensor). Biosíntesis y caracterización de nanopartículas de Ag por medio de E. coli K12 DH5 α recombinante.

Se utilizó medio líquido LB para el crecimiento de E.coli K12DH5 α , a una temperatura de 37°C, con agitación de 150 rpm por 24hrs. Se trabajó con diferentes cepas; E. coli recombinante que contiene la secuencia de la proteína quelante (Ec-PC, por las siglas en inglés), E. coli recombinante que contiene como marcador a la proteína verde fluorescente GFP (Ec-GFP) y sería utilizado como control negativo, al ir avanzando los ensayos se agregó E. coli k12 (Ec-Lab) y E. coli Top 10 recombinante con la secuencia del termosensor (Ec-TS). Se trabajó con biomasa, sobrenadante, medio de cultivo fresco (sin inocular) y cultivo completo, así como diferentes medios de cultivo que favorecieran la reducción de iones para la síntesis de AgNPs. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Adicional a la caracterización por medio de espectrometría UV-vis, se realizó microscopia electrónica de barrido (SEM) y EDXS de algunas muestras.

3. Resultados y discusiones

Se obtuvo la transformación E. coli k12DH5 α y E. coli Top 10 para la biosíntesis de nanopartículas y la expresión del termosensor respectivamente, se secuenciaron ambos genomas para asegurar la incorporación de los plásmidos a cada cepa, adicionalmente a la resistencia de kanamicina E coli



Top 10 presenta como marcador la expresión de la proteína mcherry la cual proporciona un tonalidad violeta a las UFC. La biosíntesis de nanopartículas es favorecida por la fase log DO600 0.6, adquiriendo una tonalidad del medio de cultivo amarillo, marrón a café (color característico reportado para las AgNPs, que generalmente absorben se sustituye a la cepa Ec-GFP, ya que su crecimiento es de mayor tiempo que el resto de las cepas. Se observa que otras bacterias que no han sido manipuladas genéticamente, también presentan coloración del medio y se detecta la presencia de nanopartículas, se realizan ensayos en los que se trabajó con biomasa, sobrenadante y cultivo completo, siendo este último el de mejor capacidad reductora para la formación de nanopartículas. La caracterización se realiza por espectrofotometría UV-vis, inicialmente los picos que se obtenían de AgNPs era de 260 a 280 nm, al cambiar los medios de cultivo, actualmente se obtienen picos de λ 310 a 380 nm; se realizó SEM con algunas muestras, se reportan AgNPs de un tamaño de 48.6 nm, lo cual es muy aproximado a lo reportado previamente [7] el cual es de 50 nm en *E. coli*. Previos estudios [12] refieren la biosíntesis de AgNPs por *Pseudomonas stutzeri* AG259 (1992) son de un rango de 35 a 46 nm y EDXS donde se reporta la presencia de Ag la cual aumenta de acuerdo a la concentración que fue agregada a la muestra. Las concentraciones de AgNO₃ que favorecen la biosíntesis de nanopartículas fueron; 60 mM, 1mM, 5mM y 10mM. Paralelamente se ha comprobado la viabilidad de *E. coli* en diferentes concentraciones, la cual ha sido probada favorable hasta una concentración de 240 μ M de Ag (actualmente se está probando viabilidad en las concentraciones restantes). Los ensayos se realizan por triplicado.

4. Conclusiones

Se realizaron satisfactoriamente las transformaciones de *E. coli* k12DH α y *Escherichia coli* Top 10. En la biosíntesis de AgNPs, se observó que todas las cepas tenían la capacidad de reducir y favorecer la síntesis de AgNPs (EC-PC, Ec-GFP), el cultivo completo presenta un mejor poder reductor, el medio de cultivo modificado favorece la formación del pico característico de las AgNPs que se aproximan a las reportadas en síntesis química, inicialmente eran de 260 a 280 nm, actualmente se obtienen picos de 310 a 380 nm, lo cual indica una mayor reducción de iones y una mejor biosíntesis de AgNPs. Se realizó SEM en la que se reporta AgNPs de 48.6 nm y EDXS que detecta la presencia de Ag. Las concentraciones de AgNO₃ que favorecen la biosíntesis de nanopartículas son; 60 mM, 1mM, 5mM y 10mM en la cual se determina la presencia de Ag. Se realiza prueba de viabilidad de las

cepas, aún por determinar en las concentraciones de 0.5mM y 1 mM, en las concentraciones de 0 a 240 μ M de Ag se han tenido resultados favorables. Las UFC de *Escherichia coli* Top 10 presentan coloraciones violetas en medio sólido y rosadas en medio líquido.

5. Referencias

1. Thakkar K.N, Mhatre S.S, Parikh R.Y, (2010), 'Biological synthesis of metallic nanoparticles', Nanomedicine: nanotechnology, biology, and medicine, 1:1-16.
2. Kim B.Y.S, Rutka J.T, Chan C.W.W, (2010), 'Current Concepts Nanomedicine', The new England journal of medicine, 363(25)2434-2443
3. Li X, Xu H, Chen Z-S, Guofang Chen, G., (2011), 'biosynthesis of nanoparticles by microorganisms and their applications', Journal of Nanomaterials, 1:1-16.
4. Hulkoti NI, Taranath TC, (2014), Biosynthesis of nanoparticles using microbes—A review, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 121 (2014) 474–483.
5. Schröfel A, Kratošová G, Šafarik. I, ŠafaříkováM, Raška I, Shor. L.M., (2014), Applications of biosynthesized metallic nanoparticles – A review, Acta Biomaterialia 1-20
6. Nikapitiya Ch, (2012), 'Bioactive secondary metabolites from marine microbes for drug discovery', Advances in Food and Nutrition Research, 65:363-387
7. Nath D, Banerjee P (2013), Green nanotechnology – A new hope for medical biology. Environmental toxicology and pharmacology, (3 6) 997–1014
8. Neupert J, Karcher D, Bock R., (2008), 'Design of simple synthetic RNA thermometers for temperature-controlled gene expression in *Escherichia coli*', Nucleic Acids Research, 36(19)1-9.
9. Chowdhury S, Maris C, Allain F, Narberhaus F, (2006), 'Molecular basis for temperature sensing by an RNA thermometer', European Molecular Biology Organization, 25, 2487–2497
10. Kortmann J, Narberhaus F, (2012), 'Bacterial RNA thermometers: molecular zippers and switches', Nature (10)255-265
11. Miranda-Ríos J, (2006), 'El gran mundo de los RNAs pequeños', Revista Latinoamericana de Microbiología 2006; 48 (2): 73-78
12. Klaus T, Joerger R, Olsson E, Granqvist C, 1999. Silver-based crystalline nanoparticles, microbially fabricated. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 23 (9624), 13611–13614.